

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日

2003年11月6日 (06.11.2003)

PCT

(10) 国際公開番号

WO 03/091282 A1

(51) 国際特許分類⁷: C07K 14/705, C12N 15/12, 5/10, 1/15, 1/19, 1/21, C12Q 1/02, G01N 33/15, 33/50, A61P 43/00, 3/00, 3/04, 3/08, 5/50, A61K 45/00

市 大久保 3 番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所
内 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/05184

(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU,Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県 土浦市 鈴町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).

(22) 国際出願日: 2003年4月23日 (23.04.2003)

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SI, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) 国際出願の言語: 日本語

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(26) 国際公開の言語: 日本語

添付公開書類:
— 國際調査報告書

(30) 優先権データ: 特願2002-123005 2002年4月24日 (24.04.2002) JP

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドノート」を参照。

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 萬有製薬株式会社 (BANYU PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8416 東京都 中央区 日本橋本町 2 丁目 2 番 3 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小谷 秀仁 (KOTANI,Hidehito) [JP/JP]; 〒300-2611 茨城県 つくば市 大久保 3 番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所内 Ibaraki (JP). 高橋 和彦 (TAKAHASHI,Kazuhiko) [JP/JP]; 〒300-2611 茨城県 つくば市 大久保 3 番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所内 Ibaraki (JP). 鴨田 滋 (TOKITA,Shigeru) [JP/JP]; 〒300-2611 茨城県 つくば

(54) Title: HISTAMINE RECEPTOR H3 ORDINARY ACTIVITY MUTANT AND UTILIZATION THEREOF

(54) 発明の名称: ヒスタミン受容体H3常活性変異体およびその利用

(57) Abstract: The internal domain (3) of a seven-transmembrane G protein-coupled receptor, which is meaningful in the coupling of the G protein or the activity of the receptor, is well conserved. In the H3 receptor which is one of G protein-coupled receptors, this domain is also well conserved. By transferring a point mutation into a sequence encoding this domain in the H3 receptor cDNA by the PCR method, a mutant H3 receptor having an extremely strong ordinary activity can be successfully constructed. It is further found out that use of the ordinary activity mutant of the H3 receptor makes it possible to easily and efficiently screen a candidate compound for a drug such as an inverse agonist to the H3 receptor.

(57) 要約: 7回膜貫通型G蛋白質結合受容体の内部ドメイン3はG蛋白質の結合または受容体の活性に重要でありよく保存されている。H3受容体はG蛋白質共役型受容体の一種であり、同様にこの領域は保存されていた。そこで、PCR法を用いてH3受容体cDNAにおける該領域をコードする配列に点変異を導入した結果、非常に強い常活性をもつ変異型H3受容体の作製に成功した。さらに、H3受容体の常活性変異体を用いることにより、H3受容体のインバースアゴニストなどの医薬品候補化合物をより容易に、かつ、効率的にスクリーニングできることが判明した。

WO 03/091282 A1

- 1 -

明細書

ヒスタミン受容体 H3 常活性変異体およびその利用

技術分野

本発明は、ヒスタミン受容体 H3 常活性変異体およびその利用に関する。

背景技術

多くのホルモンや神経伝達物質は、細胞膜に存在する特異的な受容体を通して生体の機能を調節している。これらの受容体の多くは共役しているグアノシン三リン酸結合蛋白質(G 蛋白質)の活性化を通して細胞内のシグナル伝達を行っている。このため、この受容体は G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) と総称されている。あるいは 7 個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、7 回膜貫通型受容体とも総称されている。

G 蛋白質共役型受容体は生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、それら生体の細胞や臓器の機能を調節する分子、例えばホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の標的として非常に重要な役割を担っている。このため、G 蛋白質共役型受容体は医薬品開発の標的として非常に注目されている。いくつかの G 蛋白質共役型受容体は常活性体であることが知られている (Costa, T. et al., Mol Pharmacol, 41, 549-560, 1992; Lefkowitz, R. et al., Trends Pharmacol. Sci., 14, 303-307, 1993)。また、G 蛋白質共役型受容体に変異を導入すると、さらに活性が上昇する場合があることが知られている。例えば、G 蛋白質共役型受容体の一種である $\alpha 1B$ -アドレナリン受容体の常活性変異体が知られている (Kjelsberg, M. A. et al., J. Biol. Chem. 267, 1430-33, 1992)。また、W001/77172 には、種々の G 蛋白質共役型受容体の常活性変異体が開示されている。

また、近年、アンダゴニストの一部にアゴニストの薬理作用と反対の作用を示

- 2 -

すもの（インバースアゴニスト）が見出され、G蛋白質共役型受容体を標的とした医薬品候補化合物になりうることが指摘された（Milligan, G. et al., Trends Pharmacol. Sci., 16, 10-13, 1995）。G蛋白質共役型受容体にインバースアゴニストが作用すると、G蛋白質共役型受容体のコンフォメーションの変化が生じ、不活性型の割合が増加すると考えられている（Milligan, G. et al., Trends Pharmacol. Sci., 16, 10-13, 1995）。

一方、G蛋白質共役型受容体の一種としてヒスタミン受容体H3（H3受容体）が知られている。該受容体をコードする遺伝子は、ヒトをはじめとする種々の生物において報告されている（Lovenberg T.W. et. al., Molecular Pharmacology, 55: 1101-1107, 1999; Lovenberg T.W. et. al., Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 293: 771-778, 2000; Tardivel-Lacombe J. et. al., Molecular Neuroscience 11: 755-759, 2000; WO2003004637）。H3受容体遺伝子ノックアウトマウスは、体重、摂食量、血中インスリン量、または、血中レプチニン量の増加を呈することが見出されており、H3受容体と体重、摂食量、血中インスリン量、または、血中レプチニン量の変化を特徴とする疾患との関連が明らかくなっている（WO2003004637）。また、H3受容体は、天然の状態でも常活性状態にあり、また常活性なコンフォメーションをとりやすいことが報告されている（Misset, S. et al., Nature, 408, 860-864, 2000）。しかしながら、これまでに、H3受容体の常活性変異体についての報告例は皆無である。

発明の開示

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、H3受容体の常活性変異体を作製し、該常活性変異体を用いた医薬品候補化合物のスクリーニング方法を提供することにある。

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を行った。7回膜貫通型G蛋白質共役型受容体の内部ドメイン3はG蛋白質の結合または受容体の活性に重

要でありよく保存されている。H3 受容体は G 蛋白質共役型受容体の一種であり、同様にこの領域は保存されていた。そこで、H3 受容体の常活性変異体の作製を試みた。まず、PCR 法を用いてマウス H3 受容体 cDNA における該領域をコードする配列に点変異を導入し、MT1、MT2、MT3、MT5、および、MT6 クローンを作製した。次いで、ワイルドタイプのマウス H3 受容体 cDNA および 5 つの変異型マウス H3 受容体 cDNA をそれぞれ HEK293 細胞株にトランスフェクションした。次いで、ELISA 法によって cAMP 量の測定を行った。検討の結果、10 μ M フォルスコリン存在下、すべてのクローンでヒスタミンにより用量依存的に cAMP 量が減少することを見出した。また、10 μ M フォルスコリン存在下、H3 インバースアゴニストであるチオペラミドにより用量依存的に cAMP 量が増加することを見出した。さらに、cAMP 量は MT1 クローンを除き、天然型 H3 受容体に比べ増加することを見出した。以上の結果は、本発明者らが、非常に強い常活性をもつ変異型 H3 受容体の作製に成功したことを示すものである。また、H3 受容体の常活性変異体を用いることにより、H3 受容体のインバースアゴニストなどの医薬品候補化合物をより容易に、かつ、効率的にスクリーニングすることができる示すものである。

即ち、本発明は、

- 〔1〕 H3 受容体の常活性変異体、
- 〔2〕 H3 受容体の内部ドメイン 3 の C 末端側に存在する活性化調節部位の少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換した、〔1〕に記載の常活性変異体、
- 〔3〕 配列番号：1 または配列番号：3 に記載のアミノ酸配列における 352 番目、353 番目、354 番目または 357 番目の少なくとも一つの部位に相当する部位のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換した、〔1〕または〔2〕に記載の常活性変異体、
- 〔4〕 H3 受容体の活性化調節部位のアミノ酸残基の置換が、下記 (a) または (b) である、〔1〕または〔2〕に記載の常活性変異体、

- 4 -

(a) ヒト H3 受容体において、RDRKVAK から、KDHKVLK、RARKVAK、RDRKVIK、または、RDRKVKK への置換

(b) マウス、ラットまたはモルモット H3 受容体において、RDKKVAK から、KDHK VLK、RAKKVAK、RDKKVIK、もしくは、RDKKVKK への置換

[5] 下記(a) ~ (c)の少なくとも一つに記載のアミノ酸置換を含む、〔1〕または〔2〕に記載の常活性変異体、

(a) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列において少なくとも、357 番目の A から K または I への置換

(b) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列において少なくとも、353 番目の D から A への置換

(c) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列において少なくとも、352 番目の R から K、354 番目の K から H、および、357 番目の A から L への置換

[6] 下記(a) ~ (c)の少なくとも一つに記載のアミノ酸置換を含む、〔1〕または〔2〕に記載の常活性変異体、

(a) 配列番号：3 に記載のアミノ酸配列において少なくとも、357 番目の A から K または I への置換

(b) 配列番号：3 に記載のアミノ酸配列において少なくとも、353 番目の D から A への置換

(c) 配列番号：3 に記載のアミノ酸配列において少なくとも、352 番目の R から K、354 番目の K から H、および、357 番目の A から L への置換

[7] 〔1〕～〔6〕のいずれかに記載の常活性変異体をコードする DNA、

[8] 〔7〕に記載の DNA が挿入されたベクター、

[9] 〔7〕に記載の DNA または〔8〕に記載のベクターを保持する形質転換細胞、

[10] 被験化合物が H3 受容体の常活性変異体の活性を変化させるか否かを評価する方法であって、

- 5 -

(a) H3 受容体の常活性変異体を発現している細胞に被験化合物を接触させる工程、

(b) 該細胞における常活性変異体の活性を検出する工程、
を含み、上記活性が、被験化合物を接触させないときに比べ増加または減少している場合に、被験化合物が、上記常活性変異体の活性を変化させると判定される方法、

[11] cAMP 濃度の変化、カルシウム濃度の変化、G 蛋白質の活性の変化、ホスホリバーゼ C の活性の変化、または、pH の変化を指標に常活性変異体の活性を検出する、[10] に記載の方法、

[12] 以下の (a) および (b) の工程を含む、H3 受容体の常活性変異体の活性を変化させる医薬品候補化合物のスクリーニング方法、

(a) [10] または [11] に記載の方法により、複数の被験化合物について、H3 受容体の常活性変異体の活性を変化させるか否かを評価する工程
(b) 複数の被験化合物から、該常活性変異体の活性を変化させると評価された化合物を選択する工程

[13] 医薬品候補化合物が H3 受容体のインバースアゴニストである、[12] に記載の方法、

を提供するものである。

H3 受容体は、常活性体であることが知られている。これに対し、本発明者らは、天然型常活性体と比較して、さらに活性が上昇している H3 受容体の常活性変異体を作製した。さらに、該常活性変異体を用いることにより、医薬品候補化合物をより容易に、かつ、効率的にスクリーニングできることを見出した。本発明は、これらの知見に基づくものである。

本発明は、H3 受容体の常活性変異体を提供する。本発明における H3 受容体の常活性変異体は、好ましくは実質的に精製されたものである。本発明において、「実質的に精製された」とは、外部の環境から切り離されて、他の成分が多くと

も40%、好ましくは25%、より好ましくは10%以下であることを意味する。また、本発明において、「常活性」とは、リガンドの非存在下での活性（リガンド非存在下でも活性を有する状態）を意味する。

本発明の常活性変異体において、その変異部位、変異タイプ、変異数に特に制限はないが、変異部位は、H3受容体の内部ドメイン3のC末端側の活性化調節部位に存在することが好ましい。また、変異タイプとしては、置換変異、欠失変異、挿入変異などが例示できるが、好ましくは置換変異である。このような変異を有する常活性変異体としては、例えばH3受容体の内部ドメイン3のC末端側に存在する活性化調節部位の少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換した常活性変異体が挙げられる。より具体的には、活性化調節部位が、KDHKVLK（配列番号：4）、RARKVAK（配列番号：5）、RDRKVIK（配列番号：6）、RDRKVKK（配列番号：7）、RAKKVAK（配列番号：8）、RDKKVIK（配列番号：9）、または、RDKKVKK（配列番号：10）配列である常活性変異体が例示できるが、本発明の常活性変異体における活性化調節部位の配列としては、これら配列に限定されるものではない。

また、本発明のH3受容体の常活性変異体としては、配列番号：1または配列番号：3に記載のアミノ酸配列における352番目、353番目、354番目または357番目の少なくとも一つの部位に相当する部位のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換した常活性変異体が例示できるが、これらの常活性変異体に限定されるものではない。例えば、上記部位に加え、さらに、その他の部位にも変異が生じている常活性変異体もまた、本発明の常活性変異体に含まれる。

本発明において、配列番号：1または配列番号：3に記載のアミノ酸配列における352番目、353番目、354番目または357番目に相当する部位としては、例えば、ラットH3受容体(Q9QYN8)では、マウスやヒトH3受容体と同様に352番目、353番目、354番目または357番目のアミノ酸部位である。

また、本発明のH3受容体の常活性変異体としては、好ましくは、ヒト、マウス、

ラットまたはモルモット（ギニアピッグ）H3受容体の常活性変異体であるが、該常活性変異体が由来する生物種は特に制限されない。

本発明におけるヒトH3受容体とは、RDRKVAK配列（配列番号：11）を有するH3受容体を意味する。本発明におけるヒトH3受容体の具体例としては、445AAのQ9Y5N1（配列番号：3）、453AAのBAB20090、および、365AAのAAK50040などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。また、本発明におけるマウス、ラットまたはモルモットH3受容体とは、RDKKVAK配列（配列番号：12）を有するH3受容体を意味する。具体的には、マウスH3受容体として配列番号：1に記載のアミノ酸配列を有するH3受容体、ラットH3受容体として445AAのQ9QYN8、449AAのBAA88765、413AAのBAA88767、および、397AAのBAA88768、モルモットH3受容体として445AAのQ9JI35が例示できるが、これらに限定されるものではない。上記の具体的な配列を有するH3受容体が、全て同様の構造的特徴、活性、および、活性化調節部位の配列（ヒトではRDRKVAK（配列番号：11）、マウス、ラットおよびモルモットではRDKKVAK（配列番号：12））を有することが報告されている。

また、本発明におけるヒトH3受容体の常活性変異体の活性化調節部位の配列は、KDHKVLK（配列番号：4）、RARKVAK（配列番号：5）、RDRKVIK（配列番号：6）、または、RDRKVKK（配列番号：7）であることが好ましいが、これらの配列に限定されるものではない。また、本発明におけるマウス、ラットおよびモルモットH3受容体の常活性変異体の活性化調節部位の配列は、KDHKVLK（配列番号：4）、RAKKVAK（配列番号：8）、RDKKVIK（配列番号：9）、または、RDKKVKK（配列番号：10）であることが好ましいが、これらの配列に限定されるものではない。

本発明におけるマウスH3受容体の常活性変異体としては、好ましくは、配列番号：1に記載のアミノ酸配列における357番目のAがKまたはIに置換した常活性変異体、353番目のDがAに置換した常活性変異体、または、352番目のRがK、354番目のKがH、および、357番目のAがSに置換した常活性変異体が挙げられ

るが、これらに限定されるものではない。例えば、上記置換変異の組み合わせが多数考え得る。

また、ヒト H3 受容体の常活性変異体としては、好ましくは、配列番号：3 に記載のアミノ酸配列における 357 番目の A が K または I に置換した常活性変異体、3 53 番目の D が A に置換した常活性変異体、または、352 番目の R が K、354 番目の K が H、および、357 番目の A が L に置換した常活性変異体が挙げられるが、これらに限定されるものではない。例えば、上記置換変異の組み合わせが多数考え得る。

本発明の H3 受容体の常活性変異体は、例えば、配列番号：1 または配列番号：3 に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードする DNA に対し、該蛋白質の活性がより上昇するような変異を導入することで作製することができる。

「配列番号：1 または配列番号：3 に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードする DNA」としては、例えば、配列番号：1 または配列番号：3 に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質の変異体、アレル、バリエント、ホモログ等をコードする DNA が含まれる。ここで「機能的に同等」とは、対象となる蛋白質が、配列番号：1 または配列番号：3 に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質と同等の生物学的機能（役割）や生化学的機能（性質）を有することを指す。本発明において、配列番号：1 または配列番号：3 に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質の生物学的機能（役割）としては、例えば、細胞内シグナル伝達機能（例えば、cAMP 濃度の変化、カルシウム濃度の変化、G 蛋白質の活性の変化、ホスホリバーゼ C の活性の変化、または、pH の変化）、または、体重、摂食量、血中インスリン量、もしくは、血中レプチン量を制御する機能が挙げられる。また、配列番号：1 または配列番号：3 に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質の生化学的機能（性質）としては、ヒスタミンやそのアナログなどと結合する性質が挙げられる。

- 9 -

このような蛋白質をコードする DNA としては、ヒト (PCT/JP99/07280、Lovenberg T. W. et. al., Molecular Pharmacology, 55: 1101-1107, 1999)、ラット (PCT /JP99/07280、Lovenberg T. W. et. al., Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 293: 771-778, 2000)、ギニアピッグ (Tardivel-Lacombe J. et. al., Molecular Neuroscience 11: 755-759, 2000)、マウス (WO200300463 7) 由来の DNA が知られており、すでにその配列が開示されている。

その他の配列を有する DNA を調製するためには、例えば、当業者であれば、部位特異的変異誘発法 (Gotoh, T. et al., Gene 152, 271-275, 1995; Zoller, MJ, and Smith, M. Methods Enzymol. 100, 468-500, 1983; Kramer, W. et al., Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456, 1984; Kramer W, and Fritz HJ Methods. Enzymol. 154, 350-367, 1987; Kunkel, TA. Proc Natl Acad Sci USA. 82, 488-492, 1985; Kunkel Methods Enzymol. 85, 2763-2766, 1988)、ダブルプライマー法 (Zoller, M. J. and Smith, M., Methods Enzymol. 154, 329-350, 1987)、カセット変異法 (Wells, et al., Gene 34, 315-23, 1985)、メガプライマー法 (Sarkar, G. and Sommer, S. S., Biotechniques 8, 404-407, 1990) などを用いて、配列番号：1 または配列番号：3 に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質をコードする DNA に適宜変異を導入することにより、該蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードする DNA を調製することができる。また、アミノ酸の変異は自然界においても生じうる。なお、変異するアミノ酸数は、通常、30 アミノ酸以内であり、好ましくは 15 アミノ酸以内であり、さらに好ましくは 5 アミノ酸以内（例えば、3 アミノ酸以内）である。

また、ある蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードする DNA を調製する当業者によく知られた他の方法としては、ハイブリダイゼーション技術 (Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9. 47-9. 58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989) を利用する方法が挙げられる。即ち、当業者においては、配列番号：1 または配列番号：3 に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質をコードする DNA 配列（例

- 10 -

えば配列番号：2）もしくはその一部を利用して、これと相同意の高いDNAを単離すること、さらに、該DNAから配列番号：1または配列番号：3に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質と機能的に同等な蛋白質を単離することは、周知の技術である。

配列番号：1または配列番号：3に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするDNAを単離するためのハイブリダイゼーションの条件は、当業者であれば適宜選択することができる。ハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、低ストリンジエントな条件が挙げられる。低ストリンジエントな条件とは、ハイブリダイゼーション後の洗浄において、例えば42°C、2×SSC、0.1%SDSの条件であり、好ましくは50°C、2×SSC、0.1%SDSの条件である。より好ましいハイブリダイゼーションの条件としては、高ストリンジエントな条件が挙げられる。高ストリンジエントな条件とは、例えば65°C、0.1×SSC及び0.1%SDSの条件である。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同意を有するDNAが効率的に得られることが期待できる。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに影響する要素としては温度や塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。

また、配列番号：1または配列番号：3に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質をコードするDNA（例えば配列番号：2）の配列情報を基に合成したプライマーを用いる遺伝子增幅法、例えば、PCR法を利用して、配列番号：1または配列番号：3に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするDNAを単離することも可能である。

これらハイブリダイゼーション技術や遺伝子增幅技術により単離されるDNAがコードする、配列番号：1または配列番号：3に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質と機能的に同等な蛋白質は、通常、配列番号：1または配列番号：3に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質とアミノ酸配列において高い相同意を有する。高い相

- 11 -

同性とは、アミノ酸レベルにおいて、通常、少なくとも 50%以上の同一性、好ましくは 75%以上の同一性、さらに好ましくは 85%以上の同一性、さらに好ましくは 95%以上の同一性を指す。

アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、例えば Karlin and Altschul によるアルゴリズム BLAST(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993)によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTN や BLASTX と呼ばれるプログラムが開発されている(Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)。BLAST に基づいて BLASTN によって塩基配列を解析する場合には、パラメーターは例えば score = 100、wordlength = 12 とする。また、BLAST に基づいて BLASTX によってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターは例えば score = 50、wordlength = 3 とする。BLAST と Gapped BLAST プログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

また、配列番号：1 または配列番号：3 に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードする DNA としては、cDNA、ゲノム DNA の他、合成 DNA も含まれる。cDNA は、例えば、配列番号：2 に記載の cDNA あるいはその断片、それらに相補的な DNA 又は RNA、または該 cDNA の配列の一部を含む合成オリゴヌクレオチドを ³²P などで標識し、配列番号：1 または配列番号：3 に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードする DNA が発現している組織（例えば、脳、視床、視床下部）由来の cDNA ライブラリーにハイブリダイズさせることによりスクリーニングすることができる。あるいは、cDNA の塩基配列に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、適当な組織（例えば、脳、視床、視床下部）由来の cDNA を錆型に PCR 反応により増幅し、クローニングすることもできる。ゲノム DNA は、例えば、配列番号：2 に記載の cDNA あるいはその断片、それらに相補的な DNA 又は RNA、または該 cDNA の配列の一部を含む合成オリゴヌクレオチドを ³²P などで標識し、ゲノム DNA ライブラリーにハイブリダイズさせることによ

- 12 -

りスクリーニングすることができる。あるいは、cDNA の塩基配列に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、ゲノム DNA を錠型に PCR 反応により増幅し、クローニングすることもできる。一方、合成 DNA は、例えば、配列番号：2 に記載の cDNA の部分配列を持つオリゴヌクレオチドを化学合成し、アニーリングさせて二本鎖にし、DNA リガーゼで結合させることにより調製することができる (Khorana, H. G. et al., J. Biol. Chem. 251, 565-570, 1976 ; Goeddel D. V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 106-10, 1979)。

本発明においては、このようにして得られた配列番号：1 または配列番号：3 に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードする DNA に対し、該蛋白質の活性がより上昇するような変異を導入する。DNA に変異が導入された結果、アミノ酸が変異する部位としては、好ましくは配列番号：1 または配列番号：3 に記載のアミノ酸配列における 352 番目、353 番目、354 番目または 357 番目の少なくとも一つの部位に相当する部位であるが、これら部位に限定されるものではない。また、変異タイプとしては、好ましくはアミノ酸置換を伴うタイプが挙げられるが、これに制限されず、具体的には、例えばアミノ酸の欠失、挿入を伴うタイプが挙げられる。

このようにして得られた H3 受容体の常活性変異体をコードする DNA から該常活性変異体を調製することは、当業者に周知の方法で実施することができる。

また、本発明は上記 H3 受容体の常活性変異体をコードする DNA を提供する。本発明の DNA は、好ましくは単離されたものである。ここで「単離された」とは、本来の環境から取り出され、実質的に精製されている状態を意味する。

このような DNA は、組換え蛋白質の生産に有用である。即ち、上記常活性変異体をコードする DNA を適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入して得た形質転換体を培養し、発現させた蛋白質を精製することにより、本発明の常活性変異体を調製することが可能である。また、本発明の常活性変異体は受容体であるため、細胞膜に発現させて調製することが可能である。

- 13 -

具体的には、宿主が大腸菌エシェリシア・コリ (*Escherichia coli*) の場合、プラスミドベクターpET-3 (Rosenberg, A. H. et al., *Gene* 56, 125-35, 1987)、pGEX-1 (Smith, D. B. and Johnson, K. S., *Gene* 67, 31-40, 1988) などが用いられる。大腸菌の形質転換は、Hanahan 法 (Hanahan, D., *J. Mol. Biol.* 166, 5 57-580, 1983)、電気穿孔法 (Dower, W. J. et al., *Nucl. Acids Res.* 16, 612 7-6145, 1988) などで行う。宿主が分裂酵母シゾサッカロマイセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) の場合には、プラスミドベクターpESP-1 (Lu, Q. et al., *Gene* 200, 135-144, 1997) などが用いられる。酵母の形質転換は、例えば、スフェロプラスト法 (Beach, D. and Nurse, P., *Nature* 290, 140, 1981)、酢酸リチウム法 (Okazaki, K. et al., *Nucleic Acids Res.* 18, 6485-6489, 1990) などにより行なわれる。

一方、宿主がほ乳動物細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞CH 0、ヒト HeLa 細胞などの場合、pMSG (クロントek社) などのベクターが用いられる。また、HEK293 細胞の場合、pcDNA3.1(+)が用いられる。ほ乳動物細胞への組換え DNA の導入は、リン酸カルシウム法 (Graham, F. L. and van der Eb, A. J., *Virology* 52, 456-467, 1973)、DEAE-デキストラン法 (Sussman, D. J. and Milman, G., *Mol. Cell. Biol.* 4, 1641-1643, 1984)、リポフェクション法 (Felgner, P. L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7413-7417, 1987)、電気穿孔法 (Neumann, E. et al., *EMBO J.* 1, 841-845, 1982) などで行われる。

宿主が昆虫細胞の場合には、パキュロウイルスベクターpBacPAK8/9 (クロントek社) などが用いられる。昆虫細胞の形質転換は、例えば、バイオ/テクノロジー (Bio/Technology, 6, 47-55, 1980) などに記載の方法に従って行なうことができる。

宿主細胞において発現させた組換え蛋白質は、公知の方法により精製することができます。また、例えば、N 末端にヒスチジン残基のタグ、グルタチオン S トランスフェラーゼ (GST) などを結合した融合蛋白質の形で合成し、金属キレート樹

脂、GST 親和性レジンに結合させることにより精製することができる (Smith, M. C. et al., J. Biol. Chem. 263, 7211-7215, 1988)。例えば、ベクターとして pESP-1 を用いた場合、目的の蛋白質は、グルタチオン S トランスフェラーゼ (GST) との融合蛋白質として合成されるため、GST 親和性レジンに結合させることより組換え蛋白質を精製できる。融合蛋白質から目的蛋白質を分離するには、例えば、トロンビン、血液凝固因子 Xa などで切断する。

また、本発明は、被験化合物が本発明の常活性変異体の活性を変化させるか否かを評価する方法を提供する。本方法においては、まず、本発明の常活性変異体を発現している細胞に被験化合物を接触させる。本方法に用いる被験化合物としては、特に制限はない。例えば、天然化合物、有機化合物、無機化合物、蛋白質、ペプチド、ヌクレオチドなどの単一化合物、並びに、化合物ライブラリー、遺伝子ライブラリーの発現産物、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物、リガンドが存在していることが予想される組織もししくは細胞（例えば、脳、視床、視床下部）の抽出液、等が挙げられるが、それらに限定されない。

また、本発明の常活性変異体を発現している細胞は、例えば、本発明の常活性変異体をコードする DNA を含むベクターを細胞（例えば、HEK293）に導入することで作製できる。ベクターの細胞への導入は、一般的な方法、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法、リポフェタミン法、マイクロインジェクション法等によって実施することができる。

また、本発明において「接触」は、例えば、細胞の培養液に被験化合物を添加することにより行うことができる。被験化合物が蛋白質の場合には、例えば、該蛋白質をコードする DNA を含むベクターを、常活性変異体が発現している細胞へ導入することも可能である。

本方法においては、次いで、細胞における常活性変異体の活性を検出する。常活性変異体の活性は、例えば、細胞内シグナル伝達（例えば、cAMP 濃度の変化、

- 15 -

カルシウム濃度の変化、G 蛋白質の活性の変化、ホスホリパーゼ C の活性の変化、または、pH の変化）を指標に検出することができる。細胞内シグナル伝達を指標とした常活性変異体の活性の検出は、当業者であれば、周知の方法により実施することができる。本方法においては、上記活性が、被験化合物を接触させないときに比べ増加または減少している場合に、被験化合物が、上記常活性変異体の活性を変化させると判定される。

すでに、H3 受容体遺伝子ノックアウトマウスは、体重、摂食量、血中インスリン量、または、血中レプチン量の増加を呈することが見出されている。従って、上記化合物は、体重、摂食量、血中インスリン量、または、血中レプチン量の変化（増加もしくは減少）を特徴とする疾患の治療または予防のための医薬品になりうる。

また、上記評価方法を利用することにより、複数の被験化合物について、常活性変異体の活性を変化させる医薬品候補化合物をスクリーニングすることが可能となる。該医薬品候補化合物としては、H3 受容体のアゴニスト、アンタゴニストおよびインバースアゴニスト（受容体と結合することにより、アゴニストの薬理作用と反対の作用を発現する反作用薬）などが例示できるが、これらに限定されるものではない。本発明におけるアゴニストおよびインバースアゴニストには、完全活性を有するものだけでなく、部分活性を有するものも包含される。本発明のスクリーニング方法は、これら種々の医薬品候補化合物のうち、特に H3 受容体のインバースアゴニストをスクリーニングすることにおいて、より有効な方法である。

図面の簡単な説明

図 1 は、H3 受容体の変異の導入を核酸配列で示す図である。m-H3 はワイルドタイプのマウス H3 受容体を意味する。

図 2 は、マウス H3 受容体の変異の導入をアミノ酸配列で示す図である。

- 16 -

図3は、ヒトH3受容体の変異の導入をアミノ酸配列で示す図である。h-H3はワイルドタイプのヒトH3受容体を意味する。

図4は、H3常活性変異体のヒスタミンに対する応答性を示す図である。

図5は、H3常活性変異体のチオペラミドに対する応答性を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により、さらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[実施例1]

7回膜貫通型G蛋白質結合受容体の内部ドメイン3(internal domain 3)はG蛋白質の結合また受容体の活性に重要でありよく保存されている。H3受容体はG蛋白質共役型受容体の一種であり同様にこの領域は保存されていた。そこでPCR法を用いてマウスH3受容体cDNAおよびヒトH3受容体cDNAにおける該領域をコードする配列に点変異を導入し、マウスH3受容体およびヒトH3受容体の常活性変異体の作製を試みた。

具体的には、まず、アミノ酸変異のデザインを考えた(図1)。次いで、マウスH3受容体cDNA(発現ベクターpcDNA3.1(+))を鑄型にプライマー722F(5'-AGA ACC CCC ACC TGA TGC -3'(配列番号:19))および1338R(5'-TCA CTT CC A GCA CTG CTC CAG G -3'(配列番号:20))、並びに、683F(5'-GCA CTC GT C TTC GGC TGG ATG -3'(配列番号:21))およびMT1(5'-CGA CTT GAG TAC CTT CTT GTC -3'(配列番号:22))、MT2(5'-CGA CTT GAG TAC CTT GTG GTC CTT CGA CAG CCG -3'(配列番号:23))、MT3(5'-CTT CTT GGC CCG CGA CA G CCG -3'(配列番号:24))、MT5(5'-CGA CTT GAT TAC CTT CTT GTC -3'(配列番号:25))、または、MT6(5'-CGA CTT CTT TAC CTT CTT GTC CCG -3'(配列番号:26))を用いてそれぞれPCRを行った。サイクルコンディションは94°C15秒、55°C30秒、72°C30秒を25回繰り返した。次いで、それぞれのPCR

- 17 -

反応により得られた断片を錠型にプライマー683F および 1338R を用いて 2 回目の PCR を行った。サイクルコンディションは 94°C 15 秒、55°C 30 秒、72°C 30 秒を 25 回繰り返した。2 回目の PCR によって生成した断片 (656bp) を pCR2.1-TOPO にクローニングした。点変異が導入されることにより MT1、MT5、および、MT6 の BstX I サイトが MT2 および MT3 の BsmFI サイトがそれぞれ消失したことを確認した。さらにシークエンスにより点変異の導入を確認した。次いで、点変異を含む Aor5 1HI-SfiI 断片 (174bp) をマウス H3 受容体 cDNA にクローニングした。PCR 反応はすべて Expand high fidelity PCR system (Boehringer mannheim) を使用した。

変異 DNA 断片をシークエンスし、点変異が導入されたことを確認した後に、Aor 51HI-SfiI 断片をワイルドタイプのマウス H3 受容体 cDNA (発現ベクター-pcDNA3.1 (+)) にクローニングした。以上的方法により MT1、MT2、MT3、MT5、および、MT6 クローンを作製した (図 2)。

ワイルドタイプのマウス H3 受容体 cDNA および 5 つの変異型マウス H3 受容体 cDNA をそれぞれ HEK293 細胞株にトランスフェクションし、G418 選別を行いそれぞれのステーブルクローン (stable clone) を得た。ノーザン解析により発現量のチェックを行い、同程度の発現量をもつステーブルクローンを実験に用いた。

同様な方法で、ヒト H3 受容体の常活性変異体を作製し (図 3)、該変異体を発現するクローンが得られる。

[実施例 2]

H3 受容体は Gi 結合型の G 蛋白質共役型受容体であるので、ELISA 法によって cAMP 量の測定を行った。具体的には、試験前日 24-ウェルプレートに 1 ウエルあたり 10^5 細胞を培養した。試験当日、非血清存在下で 15 分間培養した後、0.5mM IB MX で 15 分間処理した。フォルスコリン ($10 \mu M$)、ヒスタミン ($10^{-11}M \sim 10^{-6}M$)、チオペラミド ($10^{-10}M \sim 10^{-5}M$) をそれぞれ加え 15 分間処理した。cAMP 測定には cAMP enzymeimmunoassay (EIA) system (amersham) を用いた。キットに添付されている溶解試薬 1B $150 \mu l$ で細胞を破碎した。そのうち $5 \mu l$ のセルライセート (cell

lysate) とウサギ抗 cAMP 抗体を抗体固相化プレート中、4°Cで 2 時間静置して反応させた。さらに酵素標識抗体を加え、4°Cで 1 時間静置して反応させた。プレートを緩衝液で洗浄し酵素基質溶液を加え室温で約 30 分間静置して反応させた。1N 硫酸で反応を停止させ吸光度を測定した。標準曲線用 cAMP 溶液の吸光度より標準曲線を作成し、cAMP 量を算出した。なお、pertussis toxin (PTX) は 100ng/ml の終濃度で 18 時間処理し、同様の実験を行った。検討の結果、10 μM フォルスコリン存在下、すべてのクローンでヒスタミンにより用量依存的に cAMP 量が減少した（図 4）。

[実施例 3]

10 μM フォルスコリン存在下、H3 インバースアゴニストであるチオペラミドにより用量依存的に cAMP 量が特に MT6 クローンで増加することを見出した（図 5）。H3 受容体は天然の状態でも常活性状態にあり、また常活性なコンフォメーションをとりやすいことが報告されているが、MT6 クローンはワイルドタイプに比べ約 5 倍も cAMP の増加が観察され非常に強い常活性状態にあることが示唆された。また、チオペラミドによる cAMP 量の増加は Gi 蛋白質経路のものであるかを確かめるために pertussis toxin (PTX) を 100ng/ml の終濃度で 18 時間処理し、同様の実験を行った。その結果、PTX によりワイルドタイプ H3、MT6 クローンともにチオペラミドによる cAMP の増加が阻害された。

H3 受容体はシナプス前部に存在し、自己受容体としてヒスタミンの放出を調節している。H3 受容体は常活性体であり、ヒスタミン非存在下においても、ヒスタミンの放出を減少させる方向に働く。また、ヒスタミンが H3 受容体に結合することで、ヒスタミンの放出をさらに減少させる方向に働く。

シナプス後部にある H1 受容体にヒスタミンが結合すると、食欲を減少させる方向に働く。H1 アゴニストは抗肥満薬になりうるが、H1 の分布は、ユピキタス (Ubiquitous) であるので目的以外の作用も有する。一方、H3 アンタゴニストやインバースアゴニストは、中枢でのみ作用し、ヒスタミンの放出を増やすので、抗肥

- 19 -

満薬になり得る。

インバースアゴニストは常活性体に対しても、拮抗的な効果を示す。実際、インバースアゴニストがアンタゴニストより有効であることはすでに指摘されている (Milligan, G. et al., TiPS, 16, 10-13, 1995)。

本実施例においては、H3 受容体の内部ドメイン 3 をコードする配列に PCR 法を用いて点変異を導入することにより非常に強い常活性をもつ H3 クローンの作製に成功した。このクローンを用いることにより H3 受容体のインバースアゴニストなどのスクリーニングがより容易、かつ、効率的になるものと考えられる。

産業上の利用の可能性

本発明者らによって、H3 受容体の常活性変異体が作製された。H3 受容体の常活性変異体を用いることにより、H3 受容体のインバースアゴニストなどの医薬品候補化合物をより容易に、かつ、効率的にスクリーニングすることができる。

請求の範囲

1. H3 受容体の常活性変異体。
2. H3 受容体の内部ドメイン 3 の C 末端側に存在する活性化調節部位の少なくとも 1 つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換した、請求項 1 に記載の常活性変異体。
3. 配列番号：1 または配列番号：3 に記載のアミノ酸配列における 352 番目、353 番目、354 番目または 357 番目の少なくとも一つの部位に相当する部位のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換した、請求項 1 または 2 に記載の常活性変異体。
4. H3 受容体の活性化調節部位のアミノ酸残基の置換が、下記 (a) または (b) である、請求項 1 または 2 に記載の常活性変異体。
 - (a) ヒト H3 受容体において、RDRKVAK から、KDHKVLK、RARKVAK、RDRKVIK、または RDRKVKK への置換
 - (b) マウス、ラットまたはモルモット H3 受容体において、RDKKVAK から、KDHKV LK、RAKKVAK、RDKKVIK、もしくは、RDKKVKK への置換
5. 下記(a) ~ (c) の少なくとも一つに記載のアミノ酸置換を含む、請求項 1 または 2 に記載の常活性変異体。
 - (a) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列において少なくとも、357 番目の A から K または I への置換
 - (b) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列において少なくとも、353 番目の D から A への置換
 - (c) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列において少なくとも、352 番目の R から K、354 番目の K から H、および、357 番目の A から L への置換
6. 下記(a) ~ (c) の少なくとも一つに記載のアミノ酸置換を含む、請求項 1 または 2 に記載の常活性変異体。

- 21 -

(a) 配列番号：3に記載のアミノ酸配列において少なくとも、357番目のAからKまたはIへの置換

(b) 配列番号：3に記載のアミノ酸配列において少なくとも、353番目のDからAへの置換

(c) 配列番号：3に記載のアミノ酸配列において少なくとも、352番目のRからK、354番目のKからH、および、357番目のAからIへの置換

7. 請求項1～6のいずれかに記載の常活性変異体をコードするDNA。

8. 請求項7に記載のDNAが挿入されたベクター。

9. 請求項7に記載のDNAまたは請求項8に記載のベクターを保持する形質転換細胞。

10. 被験化合物がH3受容体の常活性変異体の活性を変化させるか否かを評価する方法であつて、

(a) H3受容体の常活性変異体を発現している細胞に被験化合物を接触させる工程、

(b) 該細胞における常活性変異体の活性を検出する工程、

を含み、上記活性が、被験化合物を接触させないときに比べ増加または減少している場合に、被験化合物が、上記常活性変異体の活性を変化させると判定される方法。

11. cAMP濃度の変化、カルシウム濃度の変化、G蛋白質の活性の変化、ホスホリバーゼCの活性の変化、または、pHの変化を指標に常活性変異体の活性を検出する、請求項10に記載の方法。

12. 以下の(a)および(b)の工程を含む、H3受容体の常活性変異体の活性を変化させる医薬品候補化合物のスクリーニング方法。

(a) 請求項10または11に記載の方法により、複数の被験化合物について、H3受容体の常活性変異体の活性を変化させるか否かを評価する工程

(b) 複数の被験化合物から、該常活性変異体の活性を変化させると評価された

- 2 2 -

化合物を選択する工程

13. 医薬品候補化合物が H3 受容体のインバースアゴニストである、請求項 1
2 に記載の方法。

1 / 5

図 1

	R	D	K	K	V	A	K	S		
m-H3	5'	CGG	GAC	AAG	AAG	GTA	GCC	AAG	TCG -3' (配列番号 : 13)	
MT1	5'	CGG	GAC	AAG	AAG	GTA	CT	C	AAG	TCG -3' (配列番号 : 14)
MT2	5'	AAG	GAC	CAC	AAG	GTA	CT	C	AAG	TCG -3' (配列番号 : 15)
MT3	5'	CGG	GCC	AAG	AAG	GTA	GCC	AAG	TCG -3' (配列番号 : 16)	
MT5	5'	CGG	GAC	AAG	AAG	GTA	AT	C	AAG	TCG -3' (配列番号 : 17)
MT6	5'	CGG	GAC	AAG	AAG	GTA	AAG	AAG	TCG -3' (配列番号 : 18)	

2 / 5

図 2

	351	360
m-H3	S R D K K V A K S L	(配列番号： 27)
MT1	S R D K K V L K S L	(配列番号： 28)
MT2	S K D H K V L K S L	(配列番号： 29)
MT3	S R A K K V L K S L	(配列番号： 30)
MT5	S R D K K V I K S L	(配列番号： 31)
MT6	S R D K K V K K S L	(配列番号： 32)

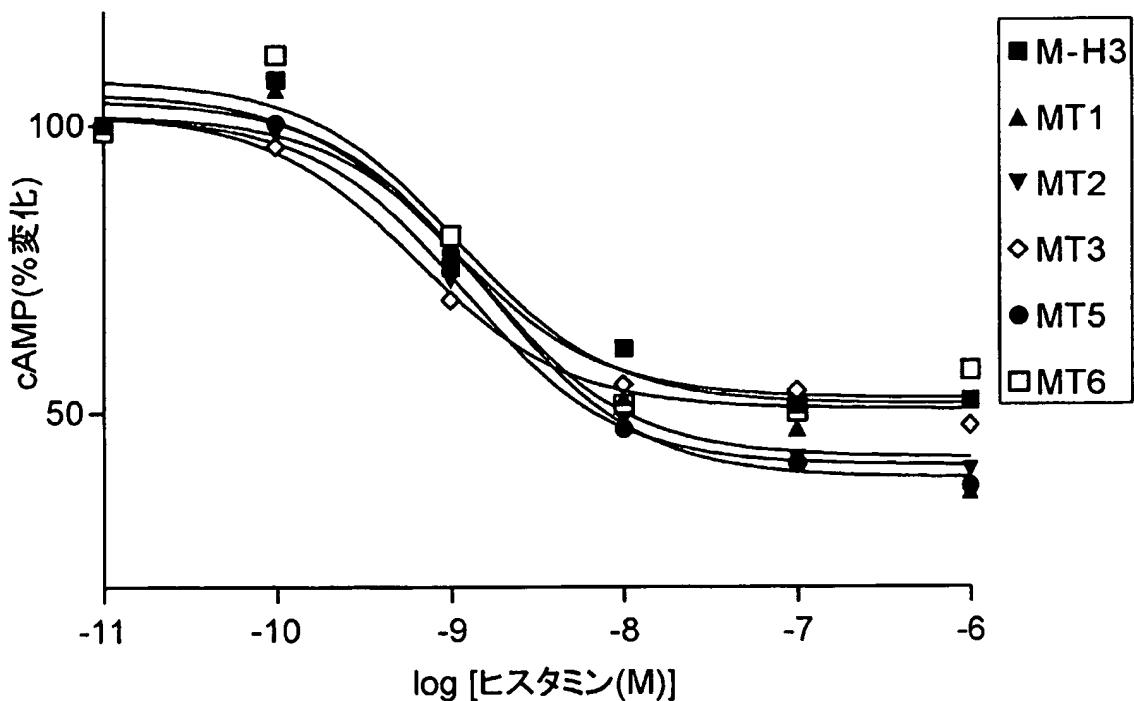
3 / 5

図 3

	351	360
h-H3	S R D R K V A K S L	(配列番号 : 33)
MT1	S R D R K V L K S L	(配列番号 : 34)
MT2	S K D H K V L K S L	(配列番号 : 35)
MT3	S R A R K V L K S L	(配列番号 : 36)
MT5	S R D R K V I K S L	(配列番号 : 37)
MT6	S R D R K V K K S L	(配列番号 : 38)

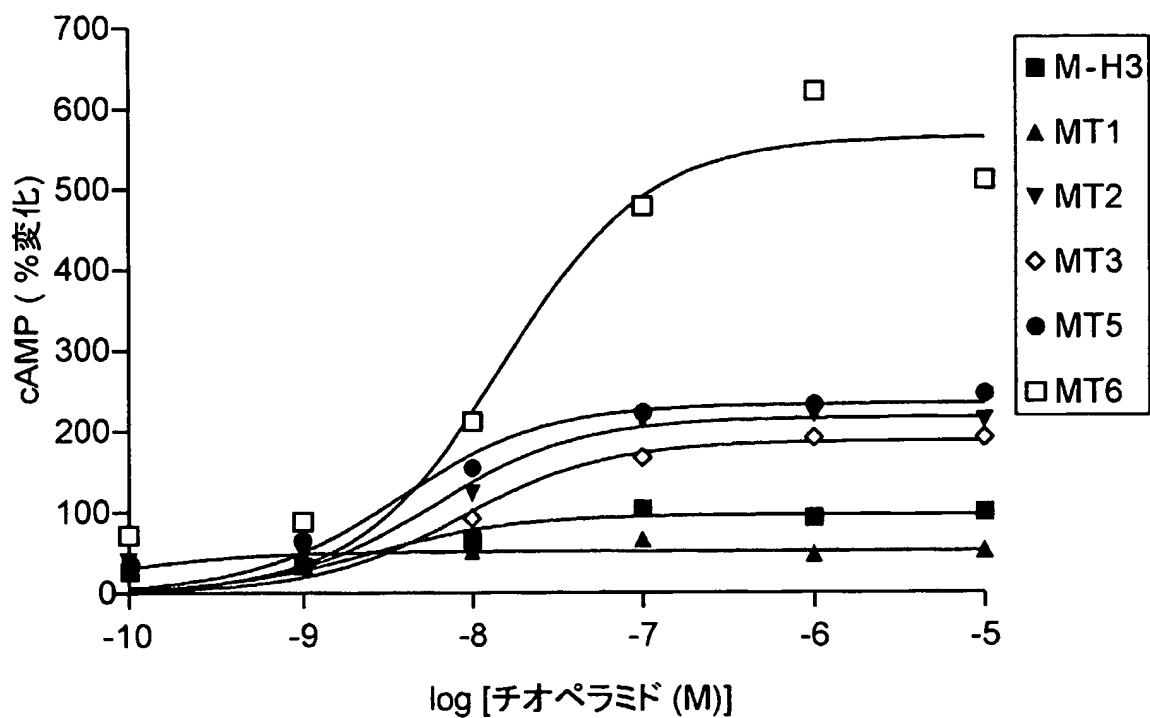
4 / 5

図 4



5 / 5

図 5



1 / 2 7

SEQUENCE LISTING

<110> BANYU PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> The constitutive activated mutants of histamine H3 receptor
and use thereof

<130> B1-A0201P

<140>

<141>

<150> JP 2002-123005

<151> 2002-04-24

<160> 38

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 445

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 1

Met Glu Arg Ala Pro Pro Asp Gly Leu Met Asn Ala Ser Gly Ala Leu

2 / 27

1 5 10 15

Ala Gly Glu Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Arg Gly Phe Ser Ala Ala

20 25 30

Trp Thr Ala Val Leu Ala Ala Leu Met Ala Leu Leu Ile Val Ala Thr

35 40 45

Val Leu Gly Asn Ala Leu Val Met Leu Ala Phe Val Ala Asp Ser Ser

50 55 60

Leu Arg Thr Gln Asn Asn Phe Phe Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp

65 70 75 80

Phe Leu Val Gly Ala Phe Cys Ile Pro Leu Tyr Val Pro Tyr Val Leu

85 90 95

Thr Gly Arg Trp Thr Phe Gly Arg Gly Leu Cys Lys Leu Trp Leu Val

100 105 110

Val Asp Tyr Leu Leu Cys Ala Ser Ser Val Phe Asn Ile Val Leu Ile

115 120 125

Ser Tyr Asp Arg Phe Leu Ser Val Thr Arg Ala Val Ser Tyr Arg Ala

130 135 140

3 / 27

Gln Gln Gly Asp Thr Arg Arg Ala Val Arg Lys Met Ala Leu Val Trp

145 150 155 160

Val Leu Ala Phe Leu Leu Tyr Gly Pro Ala Ile Leu Ser Trp Glu Tyr

165 170 175

Leu Ser Gly Gly Ser Ser Ile Pro Glu Gly His Cys Tyr Ala Glu Phe

180 185 190

Phe Tyr Asn Trp Tyr Phe Leu Ile Thr Ala Ser Thr Leu Glu Phe Phe

195 200 205

Thr Pro Phe Leu Ser Val Thr Phe Phe Asn Leu Ser Ile Tyr Leu Asn

210 215 220

Ile Gln Arg Arg Thr Arg Leu Arg Leu Asp Gly Gly Arg Glu Ala Gly

225 230 235 240

Pro Glu Pro Pro Pro Asp Ala Gln Pro Ser Pro Pro Pro Ala Pro Pro

245 250 255

Ser Cys Trp Gly Cys Trp Pro Lys Gly His Gly Glu Ala Met Pro Leu

260 265 270

His Arg Tyr Gly Val Gly Glu Ala Gly Pro Gly Val Glu Thr Gly Glu

275 280 285

4 / 27

Ala Gly Leu Gly Gly Ser Gly Gly Ala Ala Ala Ser Pro Thr

290

295

300

Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Arg Gly Thr Glu Arg Pro Arg Ser Leu

305

310

315

320

Lys Arg Gly Ser Lys Pro Ser Ala Ser Ser Ala Ser Leu Glu Lys Arg

325

330

335

Met Lys Met Val Ser Gln Ser Ile Thr Gln Arg Phe Arg Leu Ser Arg

340

345

350

Asp Lys Lys Val Ala Lys Ser Leu Ala Ile Ile Val Ser Ile Phe Gly

355

360

365

Leu Cys Trp Ala Pro Tyr Thr Leu Leu Met Ile Ile Arg Ala Ala Cys

370

375

380

His Gly His Cys Val Pro Asp Tyr Trp Tyr Glu Thr Ser Phe Trp Leu

385

390

395

400

Leu Trp Ala Asn Ser Ala Val Asn Pro Val Leu Tyr Pro Leu Cys His

405

410

415

Tyr Ser Phe Arg Arg Ala Phe Thr Lys Leu Leu Cys Pro Gln Lys Leu

5 / 27

420

425

430

Lys Val Gln Pro His Gly Ser Leu Glu Gln Cys Trp Lys

435

440

445

<210> 2

<211> 1338

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2

atggagcgcg cgccgccccga cgggctgatg aacgcgtcgg gcgctctggc cggagaggcg 60
gcggctgcag gcggggcgcg cggcttctcg gctgcctgga ccgcgtgcct ggctgcgc 120
atggcgtgc tcatcggtgc cacagtgcgt ggcaacgcgc tggcatgct cgccttcgtg 180
gcggattcga gcctccgcac ccagaacaac ttcttctgc tcaacctcgc catctccgac 240
ttcctcgtgg gtgccttctg catcccattt tatgtaccct atgtgctgac cggccgttgg 300
acctttggcc ggggcctctg caagctgtgg ctggtggttag actacctact gtgtgcctcc 360
tcagtcttca acatcggtct gatcagctat gaccgattcc tgtcagtcac tcgagctgtc 420
tcctacaggg cccagcaggg ggacacaaga cgggctgttc ggaagatggc actgggtgtgg 480
gtgctggcct tcctgctgta tggcctgcc atcctgagtt gggagtacct gtccgggtggc 540
agctccatcc ccgagggcca ctgctatgct gagttttt acaactggta ctttctcatc 600
acggcctcca ccctcgagtt cttcacaccc ttcctcagcg ttaccttctt caacctcagc 660
atctacactga acatccagag ggcactcgat cttcggtgg atggggcccg agaggctgtgtt 720
ccagaacccc cacctgatgc ccaaccctcg ccacccctcag ctccccccag ctgctggggc 780
tgctggccaa aggggcacgg ggaggccatg ccattgcaca ggtatggggt gggtgaggca 840

6 / 27

ggccctggtg ttgagactgg ggaggctggc ctcgggggtg gcagcggtgg aggcgcgtct 900
gcctcgccata cctccagctc cggcagctcc tcaaggggca ctgagaggcc acgctcaactc 960
aaaagggct ccaagccatc agcgtttca gcgtccttgg agaagcgcat gaagatggta 1020
tcccaaagca tcacccagcg ctttcggctg tcgcgggaca agaaggtagc caagtcgctg 1080
gctatcatcg tgagcatctt tggctctgc tggccccgt acacactcct catgatcatc 1140
cgggctgctt gccatggcca ctgcgtcccc gactactggt acgagacgtc cttctggctt 1200
ctgtgggcca actcggccgt caacccgtc ctctaccac tgtgccacta cagttccgt 1260
agagccttca ccaagctcct ctgccccag aagctcaagg tccagccca tggctccctg 1320
gagcagtgct ggaagtga 1338

<210> 3

<211> 445

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Glu Arg Ala Pro Pro Asp Gly Pro Leu Asn Ala Ser Gly Ala Leu

1 5 10 15

Ala Gly Glu Ala Ala Ala Gly Gly Ala Arg Gly Phe Ser Ala Ala

20 25 30

Trp Thr Ala Val Leu Ala Ala Leu Met Ala Leu Leu Ile Val Ala Thr

35 40 45

7 / 27

Val Leu Gly Asn Ala Leu Val Met Leu Ala Phe Val Ala Asp Ser Ser

50

55

60

Leu Arg Thr Gln Asn Asn Phe Phe Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp

65

70

75

80

Phe Leu Val Gly Ala Phe Cys Ile Pro Leu Tyr Val Pro Tyr Val Leu

85

90

95

Thr Gly Arg Trp Thr Phe Gly Arg Gly Leu Cys Lys Leu Trp Leu Val

100

105

110

Val Asp Tyr Leu Leu Cys Thr Ser Ser Ala Phe Asn Ile Val Leu Ile

115

120

125

Ser Tyr Asp Arg Phe Leu Ser Val Thr Arg Ala Val Ser Tyr Arg Ala

130

135

140

Gln Gln Gly Asp Thr Arg Arg Ala Val Arg Lys Met Leu Leu Val Trp

145

150

155

160

Val Leu Ala Phe Leu Leu Tyr Gly Pro Ala Ile Leu Ser Trp Glu Tyr

165

170

175

Leu Ser Gly Gly Ser Ser Ile Pro Glu Gly His Cys Tyr Ala Glu Phe

180

185

190

8 / 27

Phe Tyr Asn Trp Tyr Phe Leu Ile Thr Ala Ser Thr Leu Glu Phe Phe

195 200 205

Thr Pro Phe Leu Ser Val Thr Phe Phe Asn Leu Ser Ile Tyr Leu Asn

210 215 220

Ile Gln Arg Arg Thr Arg Leu Arg Leu Asp Gly Ala Arg Glu Ala Ala

225 230 235 240

Gly Pro Glu Pro Pro Pro Glu Ala Gln Pro Ser Pro Pro Pro Pro

245 250 255

Gly Cys Trp Gly Cys Trp Gln Lys Gly His Gly Glu Ala Met Pro Leu

260 265 270

His Arg Tyr Gly Val Gly Glu Ala Ala Val Gly Ala Glu Ala Gly Glu

275 280 285

Ala Thr Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Val Ala Ser Pro Thr

290 295 300

Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Arg Gly Thr Glu Arg Pro Arg Ser Leu

305 310 315 320

Lys Arg Gly Ser Lys Pro Ser Ala Ser Ser Ala Ser Leu Glu Lys Arg

9 / 27

325 330 335

Met Lys Met Val Ser Gln Ser Phe Thr Gln Arg Phe Arg Leu Ser Arg

340 345 350

Asp Arg Lys Val Ala Lys Ser Leu Ala Val Ile Val Ser Ile Phe Gly

355 360 365

Leu Cys Trp Ala Pro Tyr Thr Leu Leu Met Ile Ile Arg Ala Ala Cys

370 375 380

His Gly His Cys Val Pro Asp Tyr Trp Tyr Glu Thr Ser Phe Trp Leu

385 390 395 400

Leu Trp Ala Asn Ser Ala Val Asn Pro Val Leu Tyr Pro Leu Cys His

405 410 415

His Ser Phe Arg Arg Ala Phe Thr Lys Leu Leu Cys Pro Gln Lys Leu

420 425 430

Lys Ile Gln Pro His Ser Ser Leu Glu His Cys Trp Lys

435 440 445

<210> 4

<211> 7

1 0 / 2 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: An Artificially
Synthesized Peptide Sequence

<400> 4

Lys Asp His Lys Val Leu Lys

1 5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: An Artificially
Synthesized Peptide Sequence

<400> 5

Arg Ala Arg Lys Val Ala Lys

1 5

1 1 / 2 7

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: An Artificially
Synthesized Peptide Sequence

<400> 6

Arg Asp Arg Lys Val Ile Lys

1 5

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: An Artificially
Synthesized Peptide Sequence

<400> 7

Arg Asp Arg Lys Val Lys Lys

1 5

1 2 / 2 7

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: An Artificially
Synthesized Peptide Sequence

<400> 8

Arg Ala Lys Lys Val Ala Lys

1 5

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: An Artificially
Synthesized Peptide Sequence

<400> 9

1 3 / 2 7

Arg Asp Lys Lys Val Ile Lys

1 5

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: An Artificially
Synthesized Peptide Sequence

<400> 10

Arg Asp Lys Lys Val Lys Lys

1 5

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Consensus Sequence

1 4 / 2 7

<400> 11

Arg Asp Arg Lys Val Ala Lys

1 5

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Consensus Sequence

<400> 12

Arg Asp Lys Lys Val Ala Lys

1 5

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 13

cgggacaaga aggtagccaa gtcg

1 5 / 2 7

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: An Artificially
Synthesized Nucleotide Sequence

<400> 14

cgggacaaga aggtactcaa gtcg

24

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: An Artificially
Synthesized Nucleotide Sequence

<400> 15

aaggaccaca aggtactcaa gtcg

24

1 6 / 2 7

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: An Artificially
Synthesized Nucleotide Sequence

<400> 16

cgggccaaaga aggttagccaa gtcg

24

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: An Artificially
Synthesized Nucleotide Sequence

<400> 17

cgggacaaga aggtaatcaa gtcg

24

1 7 / 2 7

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: An Artificially
Synthesized Nucleotide Sequence

<400> 18

cgggacaaga aggtaaagaa gtcg

24

<210> 19

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: An Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 19

agaacccca cctgatgc

18

1 8 / 2 7

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: An Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 20

tcacttccag cactgctcca gg

22

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: An Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 21

gcactcgtct tcggctggat g

21

1 9 / 2 7

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: An Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 22

cgacttgagt accttcttgt c

21

<210> 23

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: An Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 23

cgacttgagt accttgtgggt ccttcgacag ccg

33

20 / 27

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: An Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 24

cttcttggcc cgcgacagcc g

21

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: An Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 25

cgacttgatt accttcttgt c

21

21 / 27

<210> 26

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: An Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 26

cgacttcttt accttcttgt cccg

24

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 27

Ser Arg Asp Lys Lys Val Ala Lys Ser Leu

1

5

10

<210> 28

<211> 10

22 / 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: An Artificially
Synthesized Peptide Sequence

<400> 28

Ser Arg Asp Lys Lys Val Leu Lys Ser Leu

1 5 10

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: An Artificially
Synthesized Peptide Sequence

<400> 29

Ser Lys Asp His Lys Val Leu Lys Ser Leu

1 5 10

23 / 27

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: An Artificially
Synthesized Peptide Sequence

<400> 30

Ser Arg Ala Lys Lys Val Leu Lys Ser Leu

1 5 10

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: An Artificially
Synthesized Peptide Sequence

<400> 31

Ser Arg Asp Lys Lys Val Ile Lys Ser Leu

1 5 10

24 / 27

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: An Artificially
Synthesized Peptide Sequence

<400> 32

Ser Arg Asp Lys Lys Val Lys Lys Ser Leu

1 5 10

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Ser Arg Asp Arg Lys Val Ala Lys Ser Leu

1 5 10

25 / 27

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: An Artificially
Synthesized Peptide Sequence

<400> 34

Ser Arg Asp Arg Lys Val Leu Lys Ser Leu

1

5

10

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: An Artificially
Synthesized Peptide Sequence

<400> 35

Ser Lys Asp His Lys Val Leu Lys Ser Leu

1

5

10

26 / 27

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: An Artificially
Synthesized Peptide Sequence

<400> 36

Ser Arg Ala Arg Lys Val Leu Lys Ser Leu

1 5 10

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: An Artificially
Synthesized Peptide Sequence

<400> 37

27 / 27

Ser Arg Asp Arg Lys Val Ile Lys Ser Leu

1 5 10

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: An Artificially
Synthesized Peptide Sequence

<400> 38

Ser Arg Asp Arg Lys Val Lys Lys Ser Leu

1 5 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/05184

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.C1' C07K14/705, C12N15/12, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50, A61P43/00, A61P3/00, A61P3/04, A61P3/08, A61P5/50, A61K45/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.C1' C07K14/705, C12N15/12, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50, A61P43/00, A61P3/00, A61P3/04, A61P3/08, A61P5/50, A61K45/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 01/68816 A1 (Smithkline Beecham Corp.), 20 September, 2001 (20.09.01), Sequence Nos. 1 to 2 (Family: none)	1-13
Y	WO 00/20011 A1 (Ophtho-Mcneil Pharmaceutical, Inc.), 13 April, 2000 (13.04.00), Fig. 3 & EP 1035856 A1	1-13
Y	WO 99/33978 A1 (Ban'yu Pharmaceutical Co., Ltd.), 08 July, 1999 (08.07.99), Sequence Nos. 2, 22 & EP 1043395 A1	1-13

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 25 June, 2003 (25.06.03)	Date of mailing of the international search report 15 July, 2003 (15.07.03)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/05184

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00/39164 A1 (Ban'yu Pharmaceutical Co., Ltd.), 06 July, 2000 (06.07.00), Sequence Nos. 1, 20, 25 & JP 2000-018003 A & EP 1142909 A1 & US 2002/0086359 A1	1-13
Y	Kjelsberg M.A., Constitutive activation of the alpha 1B-adrenergic receptor by all amino acid substitutions at a single site. Evidence for a region which constrains receptor activation, J. Biol.Chem., 1992, Vol.267, No.3, pages 1430-3	1-13
Y	WO 01/77172 A2 (Arena Pharmaceuticals, Inc.), 18 October, 2001 (18.10.01), Full text & EP 1301594 A2	1-13

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP03/05184

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C 1. 7 C07K14/705, C12N15/12, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50, A61P43/00, A61P3/00, A61P3/04, A61P3/08, A61P5/50, A61K45/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C 1. 7 C07K14/705, C12N15/12, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50, A61P43/00, A61P3/00, A61P3/04, A61P3/08, A61P5/50, A61K45/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリーエ	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 01/68816 A1 (Smithkline Beecham Corporation) 2001.09.20, seq. 1-2 (ファミリーなし)	1-13
Y	WO 00/20011 A1 (Ophtho-Mcneil Pharmaceutical, Inc.) 2000.04.13, Fig. 3 & EP 1035856 A1	1-13
Y	WO 99/33978 A1 (萬有製薬株式会社) 1999.07.08, Seq. 2, 22 & EP 1043395 A1	1-13

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリーエ

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 25.06.03	国際調査報告の発送日 15.07.03
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 高堀 栄二 電話番号 03-3581-1101 内線 3448  4N 3126

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	WO 00/39164 A1 (萬有製薬株式会社) 2000.07.06, Seq. 1, 20, 25 & JP 2000-018003 A & EP 1142909 A1 & US 2002/0086359 A1	1-13
Y	Kjelsberg M. A., Constitutive activation of the alpha 1B-adrenergic receptor by all amino acid substitutions at a single site. Evidence for a region which constrains receptor activation, J. Biol. Chem., 1992, Vol. 267, No. 3, pages 1430-3	1-13
Y	WO 01/77172 A2 (Arena Pharmaceuticals, Inc.) 2001.10.18, 全文 & EP 1301594 A2	1-13